

야생 벼과식물 유래 질소고정세균의 식물생장촉진 관련 특성

이수진 · 이상은 · 설경조 · 박승환¹ · 김사열*

경북대학교 미생물학과, ¹한국생명공학연구원 유전체연구센터

Plant Growth-Promoting Capabilities of Diazotrophs from Wild Gramineous Crops. Lee, Su-Jin, Sang-Eun Lee, Keyung-Jo Seul, Seung-Hwan Park¹, and Sa-Youl Ghim*. Department of Microbiology, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea, Genome Research Center, KRIBB, Daejeon 305-600, Korea – Since there could be more and rather various diazotrophs in rhizosphere of wild crops than those in rhizosphere of cultivars, some wild gramineous crops grown in Korea were collected for isolating nitrogen-fixing bacteria. Six diazotrophs were purified from their roots using nitrogen-free media. The isolated bacteria were partially identified as 4 genera by 16S rDNA sequence analysis: *Stenotrophomonas* sp., *Bosea* sp., *Klebsiella* sp., and *Azorhizobium* sp. By PCR amplification and sequence analysis, DNA fragments extracted from all isolates turned out to have an individual *nifH* homologous gene. Five isolates (KNUC163, KNUC165, KNUC169, KNUC170, and KNUC171) showed auxin activity and four isolates (KNUC163, KNUC166, KNUC170, and KNUC171) produced siderophores. Especially, 3 strains of *S. maltophilia* showed both auxin and siderophore activities. In conclusion, the isolated nitrogen-fixing bacteria might have capabilities for plant growth promotion.

Key words: Nitrogen-fixing bacteria, *nifH*, plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR), auxin, siderophores

질소는 농작물 생산에서 가장 빈번하고 유용하게 사용되는 영양원으로서 비료의 형태로 많이 사용되고 있다. 그러나 여러 가지 질소 비료가 효과는 좋은 반면 산성화와 같은 토양 오염을 일으킬 뿐만 아니라 질소 비료의 생산 공정 중에 발생하는 이산화탄소에 의한 환경 오염으로 인하여 질소 비료 사용에 대한 자제가 요구되고 있다[2, 20].

질소 비료 사용의 그러한 문제점을 해결할 수 있는 대안을 찾기 위하여 질소고정세균의 질소고정능력에 대한 연구를 비롯해 콩과, 벼과 등의 작물과 질소고정세균 간의 공생·협조 관계에 대해서도 많은 연구들이 이루어져 왔다[3, 13]. 식물의 근권에 존재하며 직·간접적으로 식물의 생장을 촉진시켜 주는 역할을 하는 토양 미생물을 PGPR(plant growth promoting rhizobacteria)이라고 한다. PGPR에 속하는 질소고정세균은 식물의 근권에 자리잡아 식물에 질소를 공급하는 것 이외에도 auxin(indole-3-acetic acid, IAA), gibberellin, cytokinin 등과 같은 식물생장촉진호르몬이나 siderophore와 같은 저분자 물질을 생산하여 식물의 생장을 촉진시키거나 식물병원성 세균에 대한 저항성을 높여주는 등 PGPR로서의 역할도 하는 것으로 알려져 왔다[5, 7-9, 11, 12, 14, 16-18, 23]. *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Xanthomonas*, *Serratia* 등에 속한

다양한 근권세균들이 PGPR로 알려져 있으며, 이들 PGPR이 벼, 보리, 옥수수, 밀, 귀리, 콩, 오이, 양파 등 농업적으로 중요한 작물의 생장과 수확량의 증가에 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀졌다[8, 11]. 한 종의 PGPR이 여러 가지 작물에 대해 생장 촉진의 효과를 보이기도 하지만, 어떤 경우에는 작물 특이성을 가져 특정한 한 종류의 작물에서만 PGPR의 특성을 나타내는 경우도 있다[11]. 여러 가지 종류의 작물에 대한 다양한 PGPR의 효과에 대한 연구는 꾸준히 지속되고 있으며, 실험 설계상의 착오와 실험 결과의 분석 시 발생하는 오차에도 불구하고 PGPR이 농작물의 수확량을 평균적으로 50~70% 정도까지 증가시킨다고 보고되었다[11].

Auxin은 대표적인 식물생장촉진호르몬으로 식물에서 줄기 세포의 신장생장을 촉진시켜줄 뿐만 아니라 뿌리의 형성 촉진, 과실의 생장 촉진, 세포분열 촉진 등과 같은 생리작용을 가지고 있어서 농업적으로 널리 이용되고 있다[5, 8, 11, 12, 14, 23]. Auxin은 아주 소량이라도 높은 활성을 나타내지만, 높은 농도에서는 식물의 종에 따라 세포의 생장을 억제하기도 한다[5, 8, 23]. Siderophore는 철과 결합하는 저분자 물질로, 세포 밖으로 분비되어 토양에 저농도로 존재하는 철과 결합하여 다시 세포 내로 흡수된다. 식물 근권에 존재하는 토양미생물이 미생물의 대사에 필수원소이나 자연계에 매우 낮은 농도로 존재하는 철 이온을 흡수하여 식물병원균이 철 이온을 흡수하는 것을 저해하거나 식물병원균의 생육을 억제시켜 식물을 보호한다[9, 14, 16]. 질소고정세균에 대한 다

*Corresponding author

Tel: 82-53-950-5374, Fax: 82-53-955-5522

E-mail: ghimsa@mail.knu.ac.kr

양한 PGPR로서의 기능을 다각도로 연구하여 실제로 농업에 적용한다면 친환경적이면서도 농작물의 병해는 줄이고 수확량은 증가시킬 수 있을 것이다. 따라서 각각의 작물과 상호작용하는 PGPR에 대한 연구가 필요하게 되었다.

앞에서 언급했듯이 여러 가지 작물에 대한 PGPR의 긍정적인 효과들에 대해 많은 연구들이 수행되었으나, 주로 식생활과 연관된 농업적으로 재배되는 작물에 대한 연구였으며[8, 11], 야생 환경에서 자라는 식물의 PGPR에 대한 연구는 거의 이루어지지 않았다. 일반적으로 재배 환경에서는 한 작물을 대량으로 재배하고, 일정한 수확을 거두기 위해 일정한 비료를 반복적으로 사용함으로써 PGPR의 종류가 제한적일 수 있을 것이다. 그러나 야생 환경에서는 재배 환경보다 다양한 식물이 분포되어 있으며, 특정한 비료의 영향도 받지 않는 환경이므로 재배 환경에서 보다 다양한 PGPR이 존재할 가능성이 높다. 따라서 야생 환경의 토양미생물들에 대해 연구를 통해 다양한 질소고정세균 및 PGPR을 확보하여 실제 농업에 적용할 수 있을 것이다.

본 연구에서는 팔공산을 포함하는 대구 지역의 야생 환경에 적응하여 자라는 벼과식물과 협조 관계를 가지는 질소고정세균을 분리하여 분류하고, 식물의 성장을 촉진할 수 있는 몇 가지 능력에 대한 실험을 수행하였기에 그 결과를 보고하고자 한다.

질소고정세균의 분리

질소고정세균을 분리하기 위해 팔공산을 비롯한 대구 인근의 산야에서 새포이풀, 왕포이풀, 그렁 등의 야생 벼과식물을 채집하여 멸균 증류수로 뿌리를 세척한 후, 뿌리와 뿌리를 씻은 물을 각각 질소원이 부족한 반고체 상태의 배지 [19]에 접종하였다. 그리고 뿌리 속에 살고 있는 내생균을 분리하기 위해 먼저 증류수로 수회 씻은 뿌리를 1.2% NaClO 용액에 15분 동안 담가 표면을 살균하였다. 다시 멸균한 증류수로 뿌리를 세척하고, 세척한 뿌리를 멸균한 막자 사발에서 갈아, 그 상층액을 동일한 배지에 접종하였다. 이들을 30°C에서 48시간 이상 배양하여 자란 균을 마이크로 피펫을 이용해 1.5% 한천이 첨가된 질소원이 부족한 배지로 옮겨 도말한 후 30°C에서 48시간 이상 배양하였다. 질소고정세균의 독립된 군락이 분리될 때까지 이와 같은 과정을 수차례 반복하여 균주를 순수분리 하였으며, 순수분리된 균들을 colony의 형태, 색깔, 크기, 그람 염색, 분리한 host의 종류에 따라 6가지로 분류하였다(KNUC163, KNUC165, KNUC166, KNUC169, KNUC170, KNUC171).

16S rDNA 염기서열 분석을 통한 부분 동정

분리균주를 동정하기 위해 질소원이 부족한 배지에서 분리된 균주로부터 genomic DNA를 추출하여, GF1(5'-TAA-CACATGCAAGTCGAACG-3')과 GR1(5'-GGTGTGACG-GGCGGTGTGTACAAG-3')을 primer로 이용해 각 균주의

16S rRNA 유전자의 PCR 증폭을 수행하였다[3]. 그 결과, 약 1.4 kb 크기의 증폭 DNA 단편을 각각 확인할 수 있었다(Fig. 1). PCR에 의하여 증폭된 단편을 전기영동 한 후 AccuPrep® Gel Purification Kit(Bioneer, Korea)를 이용하여 gel에서 회수하여 바로 염기서열을 결정하거나, 회수한 DNA 단편을 pGEM-T Easy Vector systems(Promega, USA)에 클로닝하여 *Escherichia coli* DH5α에 형질전환한 다음 AccuPrep® Plasmid Extraction Kit(Bioneer, Korea)를 사용하여 분리된 재조합 plasmid에 삽입되어 있는 DNA 단편의 염기서열을 결정하였다(Table 1).

16S rDNA 염기서열 분석 결과 KNUC163, KNUC170, KNUC171은 *Stenotrophomonas maltophilia*, KNUC165는 *Bosea thiooxidans*, KNUC166은 *Klebsiella terrigena*, KNUC169는 *Azorhizobium*에 속하는 것으로 부분 동정 되었다. 네 가지 속 모두 농업 토양에서 발견되는 대표적인 속으

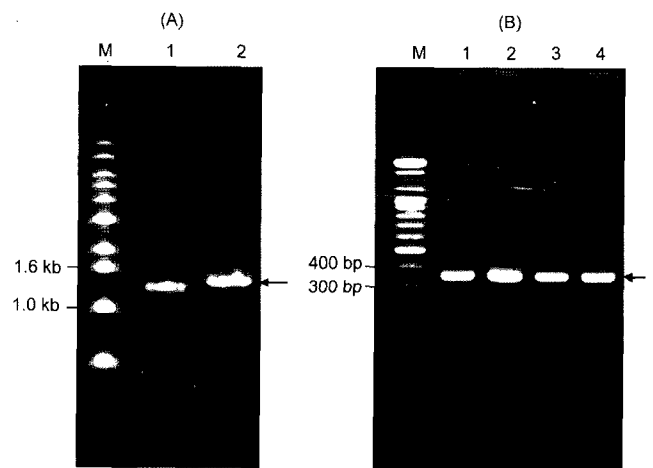


Fig. 1. PCR amplification with chromosomal DNAs of nitrogen-fixing bacteria. Panel (A), amplified 1.4 kb DNA fragments with 16S rRNA gene primers; lane M, 1 kb DNA size marker; lane 1, KNCU163; lane 2, KNUC171. An arrow indicates a size of 1.4 kb. Panel (B), amplified 360 bp DNA fragments by *nifH* gene primers; lane M, 100 bp DNA size marker; lane 1, KNUC166; lane 2, KNUC171; lane 3, KNUC170; 4, KNUC169. An arrow indicates around 360 bp in size.

Table 1. Partial identification of isolated strains from wild gramineous crops by 16S rDNA sequence analysis.

Strain	Homologous microorganism (% identity ^a)	Genbank accession no.
KNUC163	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (99%)	DQ424865
KNUC165	<i>Bosea thiooxidans</i> (99%)	DQ424863
KNUC166	<i>Klebsiella terrigena</i> (98%)	DQ424871
KNUC169	<i>Azorhizobium</i> sp. (98%)	DQ424868
KNUC170	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (99%)	DQ424872
KNUC171	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (99%)	DQ424870

^a% identity indicates percent of homology between 16S rDNA sequences of each strain to that of close relatives.

로, *Stenotrophomonas*, *Klebsiella*, *Azorhizobium* 속은 이미 질소고정세균과 PGPR로서 잘 알려져 왔다[8, 11, 12]. *Bosea* 속의 경우는 질소고정세균이나 PGPR로서 전혀 알려진 바가 없지만 nitrate 환원과 같은 질소 대사에 관련된 효소를 분비하는 것으로 알려져 있다[4, 10].

KNUC163, KNUC165, KNUC166, KNUC169, KNUC170, KNUC171 여섯 균주의 16S rDNA 염기서열을 NCBI의 GenBank에 등록하여 각각 DQ424865, DQ424863, DQ424871, DQ424868, DQ424872, DQ424870 등의 accession number를 얻었다.

Nitrogenase 활성과 *nifH* 유전자의 존재

Nitrogenase는 질소고정을 촉진시키는 효소로서 *nifD*와 *nifH* 오피론에 의해 암호화되며 근권세균에서 보편적으로 발견된다[22]. Nitrogenase의 활성은 아세틸렌 가스가 nitrogenase에 의해 에틸렌 가스로 환원되는 양을 환산하는 방법인 acetylene reduction assay(ARA)를 통해 측정하였다[3]. Nitrogenase 활성 측정 결과, 모든 균주가 0.3~30 nmol C₂H₂ h⁻¹ mg⁻¹ protein의 범주에 속해 기존의 연구 결과와 유사함을 확인할 수 있었다(data not shown)[3].

Nif 유전자는 넓은 범주의 세균들에게서 매우 보존적이므로 nitrogenase의 존재를 확인하기 위한 방법으로 universal primer를 이용한 *nifH* 유전자의 PCR 증폭과 서열 분석이 널리 이용되고 있다. 따라서 분리균주로부터 *nifH* 유전자의 존재를 확인하기 위하여 PCR 증폭을 두 단계로 수행하였다[15, 22]. 첫 단계 PCR 증폭에서 IGK(5'-TACGGYAARGCBGGY-ATCGG-3')와 NDR-1(5'-TTGGAGCCGGCRTANGCRCA-3')를 primer로 사용하였다. 1차 PCR 증폭 결과 약 1.2 kb 크기의 산물이 확인되면, PoIF(5'-TGCGAYCCSAARGCB-GACTC-3')와 PoIR(5'-ATSGCCATCATYTCRCCGGA-3')를 primer로 사용하여 두 번째 단계 PCR 증폭을 수행하였다. 2차 PCR에 의하여 증폭된 약 360 bp 크기의 DNA 단편(Fig. 1)을 전기영동으로 분리한 후, DNA PrepMate™ II Kit(Bioneer, Korea)를 이용하여 gel에서 시료를 회수하여 염기배열을 결정하였다. 결정된 염기배열을 아미노산배열로 번역한 결과, 모든 균주에서 기존의 알려진 nitrogenase iron protein과 95% 이상의 아미노산배열 상동성을 가지는 것

로 확인되었다(Table 2). 16S rDNA 염기서열 분석을 통해 *Klebsiella* 속과 *Azorhizobium* 속으로 부분 동정된 KNUC166과 KNUC169는 nitrogenase의 아미노산서열 분석 결과에서도 각각 이미 보고된 *Klebsiella* 속과 *Azorhizobium* 속 균주의 nitrogenase 아미노산서열과 98% 이상의 높은 상동성을 보였다. 반면에 *Stenotrophomonas* 속으로 부분 동정된 KNUC163, KNUC170, KNUC171과 *Bosea* 속으로 부분 동정된 KNUC165의 경우에는 이미 *nifH* 유전자를 가지는 것으로 많이 보고된 *Methylocystis* 속, *Burkholderia* 속, *Bradyrhizobium* 속 균주의 nitrogenase 아미노산서열과 95% 이상의 높은 상동성을 보였다. 따라서 본 연구가 *S. maltophilia*와 *B. thiooxidans*에서 *nifH* 유전자의 존재에 대한 최초의 보고일 것으로 여겨진다.

KNUC163, KNUC165, KNUC166, KNUC169, KNUC170, KNUC171 등 여섯 균주의 *nifH* 유전자 염기서열을 NCBI의 GenBank에 등록하여 DQ431162, DQ431163, DQ431161, DQ431164, DQ431165, DQ431166 등의 accession number를 각각 얻었다.

Auxin 생산 능력

분리균주의 auxin 생산성 여부를 확인하기 위하여 L-tryptophan을 0.1% 첨가한 King B broth 배지(Proteose Peptone no.3 2%, K₂HPO₄ 0.115%, MgSO₄ · 7H₂O 0.15%, glycerol 1.5%) 100 ml에 분리균주를 접종한 후 30°C에서 16시간 이상 배양하여 auxin 활성을 측정하였다. 배양액을 4°C에서 10,000 rpm으로 15분간 원심분리하여 상등액을 Salkowski 시약(35% HClO₄ 50 ml, 0.5 M FeCl₃ 1 ml)과 1:2의 비율로 섞어 30분간 암반응을 시킨 뒤, 분홍색으로 발색되는 반응액의 흡광도를 540 nm에서 측정하였다[6]. 이를 auxin standard와 비교하여 분리균주가 생산하는 auxin의 농도를 측정하였다.

분리균주마다 생장률이 달랐고 생장에 따른 auxin의 활성도 달랐으므로 균주의 일정한 생장 정도에서 auxin 활성을 분석하였다. 대체로 생장 곡선의 stationary phase에 접어들면서 auxin 활성이 높았으며, KNUC166 균주를 제외하고는 모두 10~30 µg/ml의 농도 범주에 속해 있음을 확인할 수 있었다(Table 3). KNUC165 균주는 생장률이 매우 느려 28시

Table 2. Comparison of *nifH* gene by partial amino acid sequence analysis.

Strain	Homologous microorganism by amino acid sequence analysis (% identity ^a)	GenBank accession no.
KNUC163	nitrogenase iron protein of <i>Methylocystis</i> sp. (98%)	DQ431162
KNUC165	nitrogenase iron protein of <i>Burkholderia fungorum</i> (95%)	DQ431163
KNUC166	nitrogenase iron protein of <i>Klebsiella pneumoniae</i> (99%)	DQ431161
KNUC169	nitrogenase iron protein of <i>Azorhizobium caulinodans</i> (99%)	DQ431164
KNUC170	nitrogenase iron protein of <i>Burkholderia fungorum</i> (96%)	DQ431165
KNUC171	nitrogenase iron protein of <i>Bradyrhizobium</i> sp. (100%)	DQ431166

^a % identity indicates percent of homology between partial amino acid sequences of each strain to that of close relatives.

Table 3. Production of indole-3-acetic acid (IAA).

Strain	Concentration of IAA (µg/ml) ^a
KNUC163	12.5 ^b
KNUC165	16.8
KNUC166	0
KNUC169	26.2
KNUC170	13.2 ^b
KNUC171	12.0 ^b

^a IAA had been estimated with absorbance at 540 nm
 Concentration of IAA means the highest value of IAA for 28 hr
^b All isolates of *S. maltophilia* showed similar auxin activities.

Table 4. Detection of siderophore-producing strains.

Strain	Production of siderophores ^a
KNUC163	+
KNUC165	-
KNUC166	+
KNUC169	-
KNUC170	+
KNUC171	+

^a Four isolates produced siderophores (+); the other 2 isolates did not (-).

간이 지나서도 stationary phase에 접어들지 않았지만 auxin 활성은 오히려 증가 추세를 유지하였다. 이 실험에서는 28 시간에서 실험을 중단하였으나, 만약 실험을 중단하지 않고 계속 수행하였다면 더 높은 auxin 활성을 보였을 것으로 추정된다.

Auxin은 매우 적은 양으로도 높은 활성을 보이며, 과다한 경우 오히려 식물의 성장을 억제하는 것으로 알려져 있다. 작물의 종류에 따라서 auxin의 최적 농도의 범위는 많이 다르지만 매우 적은 양의 차이로 인해 최적 농도와 과다 농도로 구분되므로 식물생장을 촉진시키기 위해서는 auxin의 최적 농도를 맞추어 주는 것이 중요하다[5, 8, 23]. Khalid 등 [8]의 연구를 보면, 밀의 근권 토양에서 분리된 다수의 PGPR이 L-tryptophan 존재 하에 1.8~24.8 mg/l의 auxin의 생산량을 보였으며, 이러한 auxin 생산균주를 밀에 적용하여 뿌리와 줄기의 성장촉진과 수확량 증가의 효과를 보았다. 본 연구에서는 auxin 생산균주를 직접 작물에 적용해 보지는 못하였으나, 평균적으로 10~30 µg/ml로 Khalid 등의 연구 결과와 비슷한 양을 생산하고 있으므로 작물에 적용하면 작물의 뿌리와 줄기의 성장촉진과 수확량의 증가에 영향을 미칠 것으로 예상된다.

Siderophore 생산 여부

분리균주의 siderophore 생산성 여부를 확인하기 위해 siderophore 생산균주의 감별 배지인 CAS(chrome azurol S) blue 한천 배지에 분리균주를 희석 접종하여 30°C에서 48시

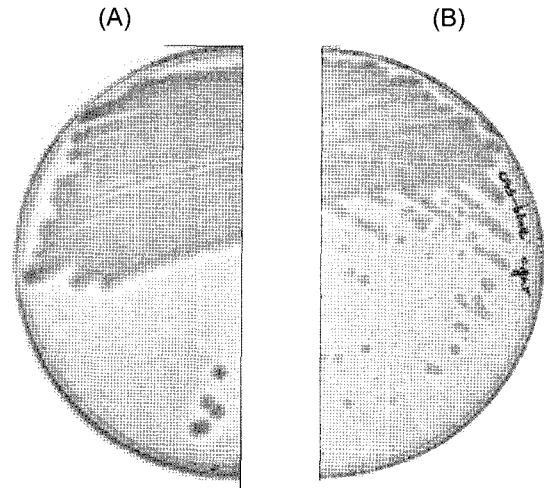


Fig. 2. Confirmation of siderophore production by color change of CAS-blue agar. Panel (A), KNUC163. The blue color of CAS-blue agar was changed to orange. Panel (B), *Rhizobium* sp. KNUC172 (negative control). The color of CAS-blue agar was not changed.

간 이상 배양시키면서 원래 배지의 푸른색이 오렌지색으로 바뀌는 것을 관찰하였다[1, 21]. 4개의 분리균주(KNUC163, KNUC166, KNUC170, KNUC171)에서 CAS blue 한천 배지의 색이 매우 뚜렷하게 오렌지색으로 변하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2). 분리된 6개의 균주 중 특별히 *S. maltophilia*는 모두 siderophore를 생산하는 것으로 나타났다. 오렌지색의 발색반응도 강력하게 나타나는 것으로 보아 *S. maltophilia*의 siderophore 활성이 높을 것으로 예상되었다. 그러나 CAS-blue agar assay를 통해서만 정성적으로 판단이 가능할 뿐이므로 분리균주들의 정확한 siderophore 활성을 측정하기 위해서는 추후 정량적인 측정이 이루어져야 할 것이다.

본 연구를 통하여 분리된 질소고정세균들이 nitrogenase 뿐만 아니라 auxin과 siderophore도 생산한다는 결과로 미루어 보아 질소고정세균이 식물 근권에서 질소고정과 식물 생장의 촉진 및 식물병원성 세균에 대한 저항성의 증가에도 중요한 역할을 할 수 있음을 추측할 수 있었다. 분리균주를 직접 작물에 적용하여 관찰해 본다면 질소고정세균의 auxin이나 siderophore에 의한 식물성장촉진 토양미생물로서의 특성을 확인할 수 있을 것이다. 친환경적인 생물학적 방제법을 개발하기 위해서도 이와 같은 질소고정세균의 다기능 PGPR에 대한 연구가 꾸준히 지속되어야 할 것이다.

감사의 글

본 연구는 과학기술부 21세기 프론티어 미생물유전체활용 기술 개발사업(과제번호: M102KK010001-02K1101-00631)의 지원에 의하여 수행되었으며, 이에 감사 드립니다.

REFERENCES

1. Bernhard, S. and J. B. Neilands. 1986. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal. Biochem.* **160**: 47-56.
2. Bockman, O. C. 1997. Fertilizers and biological nitrogen fixation as sources of plant nutrients: perspectives for future agriculture. *Plant Soil* **194**: 11-14.
3. Choi, E. H., S. E. Lee, K. S. Yoon, D. K. Kwon, J. K. Sohn, S. H. Park, M. S. Han, and S. Y. Ghim. 2003. Isolation of nitrogen-fixing bacteria from gramineous crops and measurement of nitrogenase activity. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **31**: 18-24.
4. Das, S. K., A. K. Mishra, B. J. Tindall, F. A. Rainey, and E. Stackebrandt. 1996. Oxidation of thiosulfate by a new bacterium, *Bosea thiooxidans* (strain BI-42) gen. nov., sp. nov.: analysis of phylogeny based on chemotaxonomy and 16S ribosomal DNA sequencing. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **46**: 981-987.
5. Glick, B. R., D. M. Penrose, and J. Li. 1998. A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth-promoting bacteria. *J. Theor. Biol.* **190**: 63-68.
6. Gordon, S. A. and R. P. Weber. 1951. Colorimetric estimation of indole acetic acid. *Plant Physiol.* **26**: 192-195.
7. John, F. M., M. S. Reddy, C. M. Ryu, J. W. Kloepper, and R. Li. 2003. Rhizobacteria-mediated growth promotion of tomato leads to protection against *Cucumber mosaic virus*. *Phytopathology* **93**: 1301-1307.
8. Khalid, A., M. Arshad, and Z. A. Zahir. 2004. Screening plant growth-promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. *J. Appl. Microbiol.* **96**: 473-480.
9. Kirankumar, S. M. and C. M. Ryu. 2004. Nonhost resistance: how much do we know? *Trends Plant Sci.* **9**: 97-104.
10. La Scola, B., M-N. Mallet, P. A. D. Grimont, and D. Raoult. 2003. *Bosea eneeae* sp. nov., *Bosea massiliensis* sp. nov. and *Bosea vestrisii* sp. nov., isolated from hospital water supplies, and emendation of the genus *Bosea* (Das *et al.* 1996). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**: 15-20.
11. Lucy, M., E. Reed, and B. R. Glick. 2004. Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* **86**: 1-25.
12. Park, M., C. Kim, J. Yang, H. Lee, W. Shin, S. Kim, and T. Sa. 2005. Isolation and characterization of diazotrophic growth promoting bacteria from rhizosphere of agricultural crops of Korea. *Microbiol. Res.* **160**: 127-133.
13. Patriarca, E. J., R. Tatè, and M. Iaccarino. 2002. Key role of bacterial NH_4^+ metabolism in rhizobium-plant symbiosis. *MMBR* **66**: 203-222.
14. Persello-cartieaux, F., L. Nussaume, and C. Robaglia. 2003. Tales from the underground: molecular plant-rhizobacteria interactions. *Plant Cell Environ.* **26**: 189-199.
15. Poly, F., L. Jocteur-Monrozier, and R. Bally. 2001. Improvement in the RFLP procedure for studying the diversity of *nifH* genes in communities of nitrogen fixers in soil. *Res. Microbiol.* **152**: 95-103.
16. Ramamoorthy, V., R. Viswanathan, T. Raguchander, V. Prakasam, and R. Samiyappan. 2001. Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and disease. *Crop Prot.* **20**: 1-11.
17. Ryu, C. M., M. A. Farag, P. W. Pare, and J. W. Kloepper. 2004. Invisible signals from the underground: Bacterial volatiles elicit plant growth promotion and induce systemic resistance. *Plant Pathol. J.* **21**: 7-12.
18. Shaharoon, B., M. Arshad, and Z. A. Zahir. 2006. Effect of plant growth promoting rhizobacteria containing ACC-deaminase on maize (*Zea mays* L.) growth under axenic conditions and on nodulation in mung bean (*Vigna radiate* L.). *Lett. Appl. Microbiol.* **42**: 155-159.
19. Song, S. D., S. J. Kim, and Y. S. Chu. 1990. Properties and activities of nitrogenase system of *Azospirillum amazonense* Kp1. *Kor. J. Microbiol.* **28**: 151-157.
20. Stoltzfus, J. R., R. So, P. P. Malarvithi, J. K. Ladha, and F. J. de Bruijn. 1997. Isolation of endophytic bacteria from rice and assessment of their potential for supplying rice with biologically fixed nitrogen. *Plant Soil* **194**: 25-36.
21. Sung, H. S., Y. Lim, S. E. Lee, N. W. Yang, and J. H. Rhee. 2001. CAS agar diffusion assay for the measurement of siderophores in biological fluids. *J. Microbiol. Methods* **44**: 89-95.
22. Valdes, M., N.-O. Perez, P. E. Santos, J. Caballero-Mellado, J. J. Pena-Cabrales, P. Normand, and A. M. Hirsch. 2005. Non-frankia actinomycetes isolated from surface-sterilized roots of *Casuarina equisetifolia* fix nitrogen. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 460-466.
23. Xie, H., J. J. Pasternak, and B. R. Glick. 1996. Isolation and characterization of mutants of the plant growth-promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2 that overproduce indoleacetic acid. *Curr. Microbiol.* **32**: 67-71.

(Received Mar. 6, 2006/Accepted Mar. 16, 2006)